

③ 日本国特許庁(JP)

④ 特許出願公開

⑤ 公開特許公報(A)

昭60-30682

⑥ Int. Cl.<sup>3</sup>

識別記号

庁内整理番号

⑦ 公開 昭和60年(1985)2月16日

C 12 N 9/26  
//C 12 N 9/28  
C 12 R 1/07

7236-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑧ 発明の名称  $\beta$ -アミラーゼの製造法

⑨ 特 願 昭58-139918

⑩ 出 願 昭58(1983)7月30日

⑪ 発 明 者 中 井 国 治 知多市日長字神山畔16番地

⑫ 発 明 者 横 井 信 正 愛知県西春日井郡西春日町野崎字乾出11

⑬ 発 明 者 大 矢 隆 一 愛知県西春日井郡西春日町野崎字乾出15

⑭ 出 願 人 天野製菓株式会社 名古屋市中区錦1丁目2番7号

明 細 書

1. 発明の名称

$\beta$ -アミラーゼの製造法

2. 特許請求の範囲

1. バチルス属に関する $\beta$ -アミラーゼ生産菌をサイクロデキストリン、サイクロデキストリンを生成する酵素、イソマルトース、イソマルトースを生成する酵素または糖アルコールからなる群より選ばれる一種以上を含有せしめた培地に培養し $\beta$ -アミラーゼを生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法。

2. サイクロデキストリンが $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリンまたは $\gamma$ -サイクロデキストリンである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

3. サイクロデキストリンを生成する酵素がサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

4. イソマルトースを生成する酵素が $\alpha$ -D-

グルコシダーゼである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

5. 糖アルコールがソルビトールまたはマルチトールである特許請求の範囲第1項記載の $\beta$ -アミラーゼの製造法。

3. 発明の詳細な説明

本発明はバチルス属に関する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生成蓄積せしめ、これを採取する方法において、培地に特定の添加剤を含有せしめ $\beta$ -アミラーゼの生産を増強する方法に関する。

$\beta$ -アミラーゼ(系統名:1,4- $\alpha$ -D-グルカンマルトヒドロラーゼ(1,4- $\alpha$ -D-Glucan maltohydrolase), EC 3.2.1.2)は麹類、グリコーゲン、デキストリンなどからマルトースを分離する酵素として有用である。従来 $\beta$ -アミラーゼの供給源としては主として高等植物、例えば大麦、小麦、大豆、甘藷などが利用されてきた。近年バチルス属などの微生物に $\beta$ -アミラーゼの生産能が見いだされたが、多くは生産性が低く実

用に至っているものは少ない。従来、バチルス属微生物による $\beta$ -アミラーゼ生産の改良法としては、例えば、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterius*) を澱粉を含む培地に培養する方法 (特公昭53-45393号公報)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*) を培養するに際し、バリウムイオンあるいはクエン酸または酒石酸を存在せしめた培地を用いる方法並びに種培養を特定のpHで行う方法 (特公昭52-5748号公報、同52-30590号公報、同52-30589号公報) 等が知られている。

本発明者らはバチルス属微生物の $\beta$ -アミラーゼ生産性を更に増強すべく鋭意研究したところ、培地に従来にはない特定の添加剤を含有せしめることにより著しく $\beta$ -アミラーゼの生産性が高まることを知り本発明を完成するに至った。

即ち、本発明は、バチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌を培地に培養して $\beta$ -アミラーゼを生産蓄積せしめ、これを採取する方法において、培地にサイクロデキストリン、サイクロデキストリンを生産する酵素、イソマルトース、イソマル

トースを生産する酵素または糖アルコールからなる群より選ばれる一種以上を含有せしめることを特徴とする $\beta$ -アミラーゼの製造法に関する。本発明においてサイクロデキストリンとしては $\alpha$ -サイクロデキストリン、 $\beta$ -サイクロデキストリンまたは $\gamma$ -サイクロデキストリンが例示される。サイクロデキストリンを生産する酵素としてはサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ (Cyclodextrin glucanotransferase, EC 2.4.1.195)、イソマルトースを生産する酵素としては $\alpha$ -D-グルコシダーゼ ( $\alpha$ -D-Glucosidase, EC 3.2.1.20) が例示される。また糖アルコールとしてはフルビトールまたはマルチトールがそれぞれ例示される。

上記添加剤のうち $\alpha$ -D-グルコシダーゼは通常マルトースなどを基質としてその $\alpha$ -1,4-グルコシド結合を加水分解する酵素として知られているが、特定の反応条件下では基質からグルコース残基を種々の糖およびアルコールなどへ転移する活性、即ちトランスグルコシダーゼ活性を持つも

のがある。本発明で使用する $\alpha$ -D-グルコシダーゼはトランスグルコシダーゼ活性を有するものでなければならない。

本発明法で使用する微生物はバチルス属に属する $\beta$ -アミラーゼ生産菌であればいずれでもよく、例えばバチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、バチルス・メガテリウム (*B. megaterius*)、バチルス・サーキュランス (*B. circulans*)、バチルス・ポリミキサ (*B. polymyxa*) 等が示される。より具体的にはバチルス・セレウス IFQ 3501、バチルス・セレウス・バリエータス・ミコイデス (*B. cereus* var. *mycoides*) IAH 1190、バチルス・メガテリウム IAH 1030、バチルス・サーキュランス IFQ 3329、バチルス・ポリミキサ IFQ 3020、バチルス・ポリミキサ ATCC 8523などの保存菌種が例示される。

上記菌種を培養するための培地としては炭素源、窒素源、無機塩、有機酸および発育素などと前記特定の添加剤を含む培地であれば合成培地または天然培地のいずれでも用いることができる。例

えば、炭素源としてはシェークロース、アミロース、アミロペクチン、ポチトスターチ、コーンスターチ、コーンミール、ウキシースターチなど、窒素源としてはミルクカゼイン、ポリペプトン、大豆カゼイン、酵母エキス、肉エキスなど、無機塩としては塩化ナトリウム、硫酸マグネシウム、リン酸二カリウム、塩化亜鉛、塩化バリウム、硫酸カリウム、硫酸銅、塩化亜硫酸、酸化カルシウム、リン酸一ナトリウム、リン酸二ナトリウムなど、有機酸としてはクエン酸ナトリウムなど、発育素としてはビタミンB<sub>1</sub>、ビオチン、ビタミンB<sub>6</sub>、D-パンチン酸ナトリウム、イノシトールなどが用いられる。

本発明で添加剤として用いるサイクロデキストリン、イソマルトースまたは糖アルコールは発菌菌の培地に添加することでもできるが、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼ並びに $\alpha$ -D-グルコシダーゼは熱に弱いので、発菌後の培地の温度が約30℃に冷却されたときに添加するようにしなければならない。添加剤の培地中での

使用量は、例えばサイクロデキストリンおよびイソマルトースの場合は約0.001~1%（g/v%、以下同じ）、サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼは約0.01~10u/瓶、α-D-グルコシダーゼはトランスグルコシダーゼ活性として約0.1~100 u/瓶また糖アルコールは約0.01~5%である。

本発明で使用する菌株の培養条件としては、培養温度は菌が生育しβ-アミラーゼが生産される範囲内であればよく、通常約25~35℃であり、培地のpHは約7.5~9.0である。また培養時間はβ-アミラーゼの活性が最大に達する時間を選べばよく、通常約50~70時間である。

以上のようにして得られた培養物からβ-アミラーゼを採取するには、公知の方法に従って行えばよい。例えば、まず遠心分離、ろ過などにより菌体を除去したのち、上清またはろ液を濃縮、有機溶媒沈澱することにより粗酵素粉末が得られ、さらに限外ろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲルろ過などの公知

の方法を適宜組み合わせることにより精製β-アミラーゼ標品が得られる。

本発明におけるβ-アミラーゼ活性の単位は、0.5%可溶性澱粉液（pH7.0、リン酸緩衝液）を基質として48℃、30分間反応し、生じた還元糖量をフェーリング・レーマン・シュール（Fehling-Lehmann-Schörl）法により測定したとき、10mgのグルコースに相当する還元力のマルトースを生成する酵素量を1単位とした。また、添加剤として使用するサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼおよびα-D-グルコシダーゼの活性単位はそれぞれチルデン・ハドソン（TILDEN-HADSON）単位（ジャーナル・オブ・アプライド・ケミカル・バイオテクノロジー（J. Appl. Chem. Biotechnol.）第21巻、339頁、1971年）、トランスグルコシダーゼ単位（日本醸造協会雑誌、第72巻、458頁、1977年）によった。

以下、実施例を以て本発明を詳しく説明する。

#### 実施例 1

可溶性デンプン 1.0%、ミルクカゼイン 3.5%

、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム 0.01%、硫酸マグネシウム・7水塩 0.1%、リン酸二カリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ビタミンB<sub>6</sub> 塩酸塩 2ppm およびクエン酸ナトリウム 0.03%からなる組成の培地（pH8.2）50mlを500ml容の瓶口プラスチックに入れて殺菌後、第1表に示すごとく各添加剤を各濃度となるように加え、同表に示すバチルス属菌株を接種した。28℃において60時間間接培養したのち、培養液のβ-アミラーゼ活性を測定した。

なお、添加剤として使用したサイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼはバチルス・マセランス（*Bacillus macerans*）起原の酵素（天野製薬社製）であり、トランスグルコシダーゼはアスペルギルス・ニガー（*Aspergillus niger*）起原の酵素（同社製）である。また、サイクロデキストリン混合物とは澱粉に上記サイクロデキストリングルカノトランスフェラーゼを作用させて調整したβ-サイクロデキストリン約30%、グルコース約4%、マルトース約11%、その他約55%

の混合物であり、イソマルトース混合物とは澱粉加水分解物に上記トランスグルコシダーゼを作用させて調整したイソマルトース約35%、パノース約26%、イソマルトリオース約11%、その他のオリゴ糖約28%の混合物である。

添加剤を加えない場合の活性を100%としたときの相対活性を第1表に示す。同表から本発明法による効果がよくわかる。

（以下余白）

第 1 表

添 加 剤	濃 度	<i>B. cereus</i> IFO 3001	<i>B. cereus</i> var. <i>spizoides</i> IAB 1398	<i>B. pasteurianus</i> IAB 1838	<i>B. circulans</i> IFO 3323	<i>B. polymyxa</i> IFO 3026	<i>B. polymyxa</i> ATCC 8523
無 添 加		100%	100%	100%	100%	100%	100%
ローサイクロデキストリン	0.001%	127%	138%	124%	121%	123%	122%
	0.1	155	161	141	135	159	148
ローサイクロデキストリン	0.001	119	128	128	119	125	136
	0.1	151	159	145	138	147	153
ローサイクロデキストリン	0.001	130	131	120	132	138	131
	0.1	161	163	144	147	159	158
サイクロデキストリン混合物	0.001	120	134	129	132	141	145
	0.1	181	181	125	130	138	132
イソマルトース	0.001%	115	128%	121%	126%	118%	116%
	0.1	132	135	129	131	138	125
イソマルトース混合物	0.001	128	138	132	121	137	124
	0.01	135	127	136	117	135	132
サイクロデキストリン グルコノトランスフェラーゼ	2.0g/20	167%	183%	139%	148%	166%	154%
トランスグルコシダーゼ	20	136	135	131	140	134	136
マルチール	0.5%	165%	158%	145%	147%	161%	158%
ソルビール	0.5	199	144	138	131	142	145

### 実施例 2

実施例 1 に示したと同じ組成の培地 50ml を 500ml 容の坂口フラスコに入れて殺菌後、ローサイクロデキストリン 90:ローサイクロデキストリン 5:ローサイクロデキストリン 5 の混合物を 0.1%、ローサイクロデキストリン 50:イソマルトース 50 の混合物を 0.1% および ローサイクロデキストリン 20:マルチール 80 の混合物を 0.5% となるように加え、パチルス・ポリミキサ ATCC 8523 株を接種し、28℃において 60 時間振盪培養したところ、相対湿度は各々 160, 158, 168 % であった。

### 実施例 3

ポテトスターチ 0.5%、ポリペプトン 2.0%、リン酸二カリウム 0.3%、硫酸マグネシウム 7 水塩 0.1% からなる組成の培地 (pH 7.5) 50ml を 500ml 容坂口フラスコに入れて殺菌後、パチルス・セレウス IFO 3001 株一白金耳を接種し、28℃で 7 時間振盪培養し培養液とした。次いで、可溶性デンプン 1.0%、ミルクカゼイン 3.5%、酵母エキス 0.1%、塩化ナトリウム 0.01%、硫酸マ

グネシウム・7 水塩 0.1%、リン酸二カリウム 0.4%、グリシン 0.075%、ビタミン B<sub>1</sub> 硫酸塩 2ppm、クエン酸ナトリウム 0.03% および ローサイクロデキストリン 0.01% からなる組成の培地 (pH 8.2) 15ml の入った 30ml 容ジャーファーマンターに上記培養液を接種し、28℃、60 時間培養した。

培養液を遠心分離して菌体を除いたのち、上清を廃棄し過剰液、次いでアルコール沈降をすることにより粗グアーミラーゼ粉末 93g を得た。

特許出願人 天野製薬株式会社